

DOCKET NO.: 255062US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Joel COTTON, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/00129

INTERNATIONAL FILING DATE: January 16, 2003

FOR: PHOSPHINIC PSEUDOPEPTIDE DERIVATIVES FOR THE SELECTIVE INHIBITION OF
THE C-TERMINAL ACTIVE SITE OF ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME (ACE)**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 00599	18 January 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the
International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/00129. Receipt of the certified
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)



REC'D 07 APR 2003

WIPO

PCT

X3

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 DEC. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

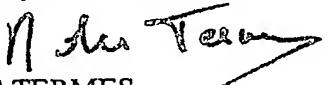
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W/260899

1 REMISE EN PLÈGES DATE 18 JAN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		Réserve à l'INPI 2 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS 422-5/S002	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> B 13999.3 MDT BD 1406			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
3 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° N°	Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/>		N°	Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
4 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
DERIVES DE PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES INHIBANT SELECTIVEMENT LE SITE ACTIF C-TERMINAL DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I(ACE)			
5 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	
6 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public de Caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue 31-33, rue de la Fédération		
	Code postal et ville 75752 PARIS 15ème		
Pays FRANCE			
Nationalité Française			
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			

REMISSION	10 JAN 2002	Réervé à l'INPI
DATE	75 INPI PARIS	
LIEU	0200599	
N° D'ENREGISTREMENT		DB 540 W /260899
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

7. Vos références pour ce dossier : (facultatif)		B 13999.3 MDT BD 1406	
8. MANDATAIRE			
Nom		DES TERMES	
Prénom		Monique	
Cabinet ou Société		BREVATOME 422-5/S002	
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 7068	
Adresse	Rue	3, rue du Docteur Lancereaux	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01 53 83 94 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 45 63 83 33	
Adresse électronique (facultatif)		brevets.patents@brevalex.com	
9. INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
10. RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
11. RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes			
12. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
 M. DES TERMES		M. MARTIN	

DERIVES DE PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES INHIBANT
SELECTIVEMENT LE SITE ACTIF C-TERMINAL DE L'ENZYME
DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I (ACE)

5.

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention a pour objet des dérivés de pseudo-peptides phosphiniques, capables d'inhiber 10 sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I humaine (ACE) humaine et de souris, sans affecter le site actif N-terminal de l'ACE.

Ces dérivés peuvent être utilisés dans différentes 15 pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

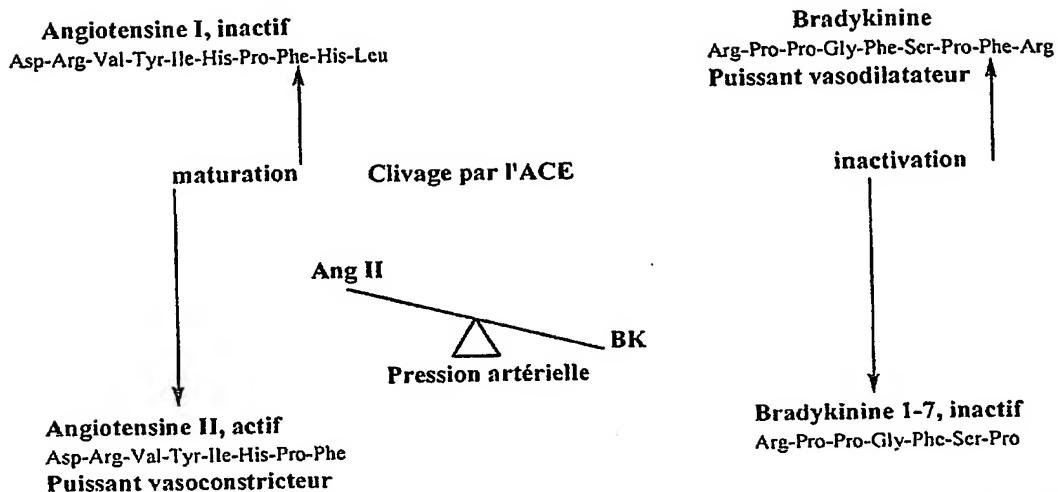
Etat de la technique antérieure

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) est un acteur central de la régulation de la pression 20 artérielle et de l'homéostase des différentes fonctions physiologiques du tissu cardiovasculaire. Ces actions semblent en partie dépendre :

- de la maturation d'un puissant vasoconstricteur, l'angiotensine II, par clivage de l'extrémité C-terminale de l'angiotensine I, peptide inactif, par l'ACE, et
- de la dégradation par l'ACE d'un puissant vasodilatateur, la bradykinine.

30

Ces actions sont illustrées ci-dessous.



L'hypertension artérielle, mais aussi les maladies du tissu cardiaque, résultent d'une dérégulation des différentes hormones vasoconstrictrives. Rétablir l'équilibre entre agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs, au profit de ces derniers, est un des principaux objectifs thérapeutiques des médicaments utilisés en clinique humaine pour remédier à l'hypertension artérielle et aux maladies du tissu cardiaque. On comprend ainsi comment l'inhibition de l'ACE peut participer à ces objectifs, en empêchant la formation de l'angiotensine II et en potentialisant la bradykinine. Les inhibiteurs de l'ACE sont utilisés en clinique humaine, non seulement pour réduire l'hypertension artérielle, mais aussi pour préserver les fonctions du tissu cardiaque, comme il est décrit dans les références [1] et [2].

Le clonage de l'ACE, puis la détermination de sa structure primaire, ont montré de façon surprenante la présence de deux sites actifs dans cet enzyme, comme il est décrit dans la référence [3]. Par mutagénèse

dirigée, il a pu être prouvé que ces deux sites actifs étaient parfaitement fonctionnels, c'est à dire capables de cliver des substrats physiologiques de l'ACE, tels que l'angiotensine I et la bradykinine 5 (voir références [4] et [5]).

Malgré tous les travaux réalisés depuis plus de vingt ans sur l'ACE, on ne sait toujours pas si la présence de deux sites actifs dans l'ACE de mammifères, résultant d'une duplication de gène ancestral, 10 correspond à un rôle fonctionnel particulier. Cependant la découverte récente, qu'*in vivo* chez l'homme le peptide Ac-SDKP (N-acétyl Ser-Asp-Lys-Pro) est essentiellement clivé par le site actif N-terminal de l'ACE, milite en faveur d'un rôle fonctionnel distinct 15 pour chacun des sites actifs de l'ACE (voir référence [6]).

Ces considérations ont conduit à développer des inhibiteurs qui seraient capables de discriminer de façon hautement sélective les deux sites actifs de l'ACE, afin de disposer d'outils pouvant permettre 20 d'établir *in vivo* le rôle fonctionnel de chacun des sites de l'ACE. A cet égard, il est important de souligner que tous les inhibiteurs utilisés à ce jour en clinique sont des inhibiteurs mixtes de l'ACE, c'est 25 à dire bloquant simultanément les deux sites actifs de l'ACE.

Toutefois, on a mis au point récemment le premier inhibiteur bloquant de façon sélective le site N-terminal de l'ACE, le RXP407 qui est un pseudo-peptide 30 phosphinique. Cet inhibiteur est décrit dans les références [7] et [8]. Cet inhibiteur, non métabolisé

chez le rat et la souris, est par ailleurs capable d'inhiber la dégradation du peptide N-acétyl Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP), *in vivo* chez la souris (voir référence [9]). Cet inhibiteur fait l'objet d'une étude pré-clinique chez cet animal, visant à démontrer son utilité pour protéger le tissu hématopoïétique lors de traitements de chimiothérapie. Par ailleurs, on a pu observer que malgré l'inhibition de la dégradation *in vivo* de l'Ac-SDKP par le RXP407, dans ces conditions, l'injection de l'angiotensine I aux souris traitées conduisait toujours à une augmentation de la pression artérielle (voir référence [9]).

Ces résultats indiquent donc qu'*in vivo* :

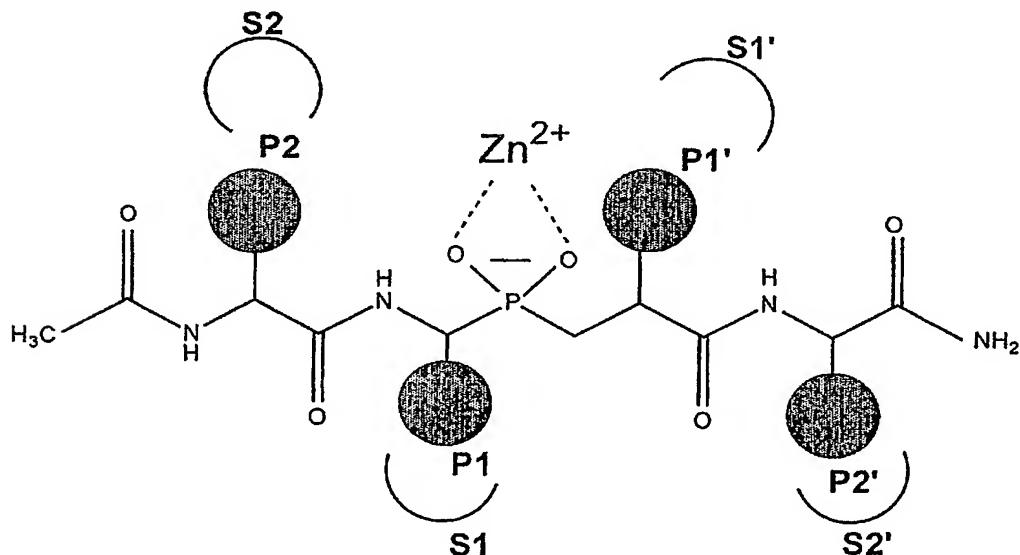
- l'injection de RXP407 en bloquant le site N-terminal de l'ACE empêche la dégradation de l'Ac-SDKP, et

- le site C-terminal, non inhibé par le RXP407, peut à lui seul prendre en charge l'hydrolyse de l'angiotensine I.

Cette dernière observation suggère que le site C-terminal de l'ACE pourrait *in vivo* être seul responsable de la dégradation de l'angiotensine I, justifiant ainsi le développement d'inhibiteurs sélectifs du site C-terminal de l'ACE. Selon ces hypothèses, de tels inhibiteurs pourraient permettre, par la seule inhibition du site C-terminal de l'ACE, de contrôler le métabolisme de l'angiotensine I et donc de prévenir les effets vasoconstricteurs liés à la production *in vivo* de l'angiotensine II. Un avantage de

tels inhibiteurs, par rapport aux inhibiteurs mixtes classiques de l'ACE, serait de ne pas interférer avec les fonctions physiologiques liées à l'activité du site N-terminal de l'ACE, comme le métabolisme du peptide 5 Ac-SDKP. Une autre retombée extrêmement importante des inhibiteurs C-terminaux pourrait être aussi le contrôle du métabolisme de la bradykinine (BK), un autre acteur central de l'homéostase cardiovasculaire, s'il 10 s'avérait que ce peptide est clivé *in vivo* essentiellement par le site C-terminal de l'ACE.

Il a été démontré que les peptides phosphiniques représentent une famille générique de composés capables d'inhiber, de façon très puissante, les métallopeptidases à zinc, famille de peptidases à 15 laquelle appartient l'ACE, comme on peut le voir dans les références [9] à [16]. Dans ces composés, le rôle du groupe PO_2^- est d'interagir avec l'atome de zinc situé dans le site actif de ces enzymes.



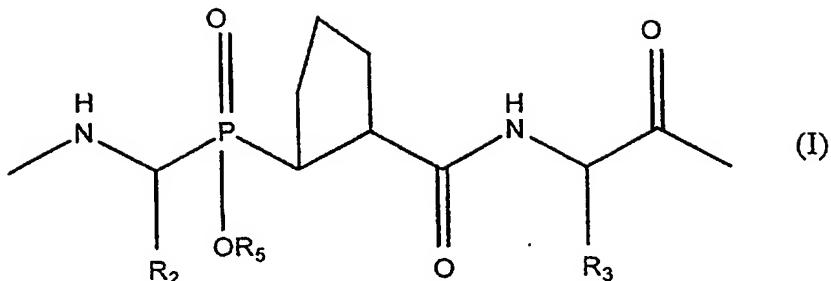
Outre la présence du groupe PO_2^- , la nature chimique des résidus P2, P1, P1' et P2' joue un rôle déterminant pour assurer la sélectivité des interactions entre un peptide phosphinique particulier et une métallopeptidase à zinc donnée (voir références [8], [12] et [13]). Ainsi, la présence de résidus bien particuliers dans les positions P2, P1, P1' et P2' permet d'obtenir des inhibiteurs sélectifs, n'inhibant que certaines métallopeptidases à zinc. Une telle sélectivité peut être un facteur essentiel dans le cadre d'une utilisation *in vivo* de ces inhibiteurs. En effet, on estime que la toxicité *in vivo* de certains inhibiteurs est en grande partie due à leur manque de sélectivité pour une cible donnée.

Selon ces principes, la recherche d'inhibiteurs capables de bloquer sélectivement le site C-terminal de l'ACE a consisté à identifier dans la famille des composés phosphiniques, des résidus particuliers, situés dans les positions P1, P1' et P2', conférant aux inhibiteurs une capacité à interagir sélectivement avec le site C-terminal de l'ACE.

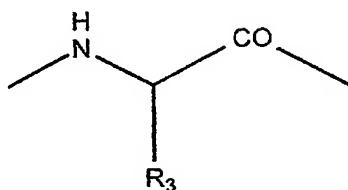
Exposé de l'invention

Ces recherches ont conduit à découvrir que la présence d'un résidu pseudo-proline dans des pseudo-peptides phosphiniques constitue un élément essentiel pour obtenir des inhibiteurs sélectifs du site C-terminal de l'ACE.

Aussi, la présente invention a pour objet un dérivé de pseudopeptide phosphinique comportant la séquence d'acides aminés de formule suivante :



5 dans laquelle R_2 et R_3 qui sont identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



10 pouvant aussi former le résidu Pro, et R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable in vivo.

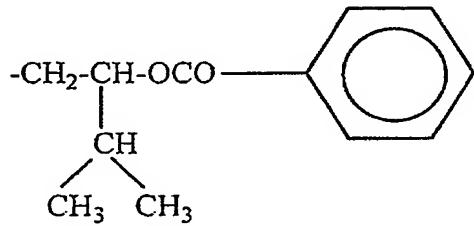
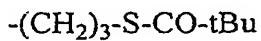
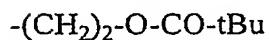
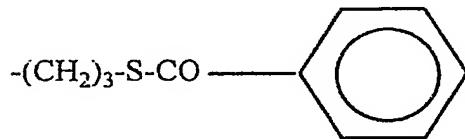
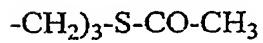
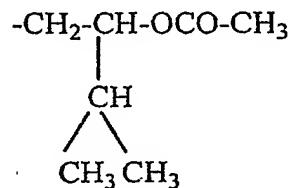
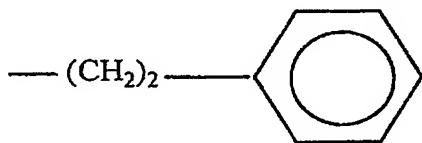
15 Dans cette séquence, le groupe PO_2 peut être sous forme PO_2^- en étant associé à un atome d'hydrogène ou à un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, par exemple K^+ , Na^+ , NH_4^+ ou tout autre ion métallique ou non métallique acceptable du point de vue pharmacologique. La nature du contre-ion n'a aucune 20 importance car dans l'eau les groupements chargés sont dissociés.

Le groupe PO_2 peut aussi être sous forme d'ester phosphinique hydrolysable in vivo. Dans ce cas, le pseudo-peptide est du type pro-drogue et, après

hydrolyse in vivo de l'ester, il génère la forme active du pseudo-peptide.

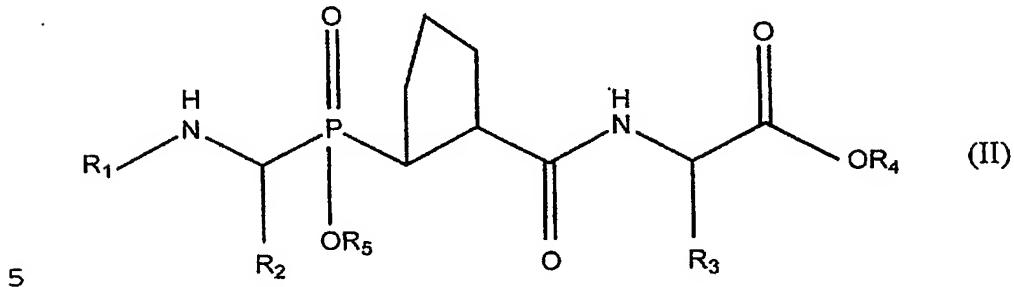
Des groupes de ce type utilisables pour R_5 sont décrits en particulier dans la référence [20].

5 A titre d'exemples de tels groupes, on peut citer les groupes répondant aux formules suivantes :

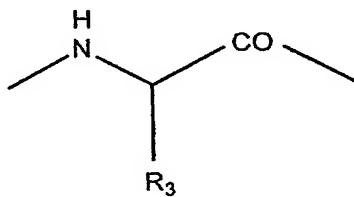


10 Dans ces formules, t-Bu représente le groupe tert-butyle.

Selon un mode particulier de réalisation, le dérivé de pseudo-peptide phosphinique répond à la formule suivante :



10 dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine, R_2 et R_3 qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



15 pouvant aussi former le résidu Pro, R_4 représente un atome d'hydrogène, ou un contre-ion pharmaceutiquement acceptable, et R_5 est tel que défini ci-dessus.

20 Dans les formules données ci-dessus, R_2 et R_3 représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, par exemple un pseudo-acide aminé.

Les acides aminés naturels peuvent être choisis parmi l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide

aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la norleucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, l'hydroxyproline, la sérine, 5 la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, la nitrophénylalanine, l'homoarginine, la thiazolidine et la déshydropoline.

Un pseudo-acide aminé peut être défini comme un acide aminé dans lequel la fonction amino ou carbonyle 10 a été remplacée par un autre groupement chimique.

Dans la formule (II), le groupe R_1 peut être un groupe protecteur usuel d'une fonction amine en chimie peptidique. De tels groupes protecteurs sont bien connus de l'homme du métier et sont illustrés par 15 exemple dans l'ouvrage intitulé : "Protective groups in Organic Synthesis, Second Edition, T.W. Greene et P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, Inc, pages 309-315 [17]. A titre d'exemple de tels groupes utilisables dans l'invention, on peut citer les groupes acétyle et 20 benzyloxycarbonyle.

R_1 peut aussi représenter un acide aminé naturel ou non naturel ou un peptide dont la fonction amine terminale est protégée par un groupe protecteur usuel tel que ceux décrits ci-dessus.

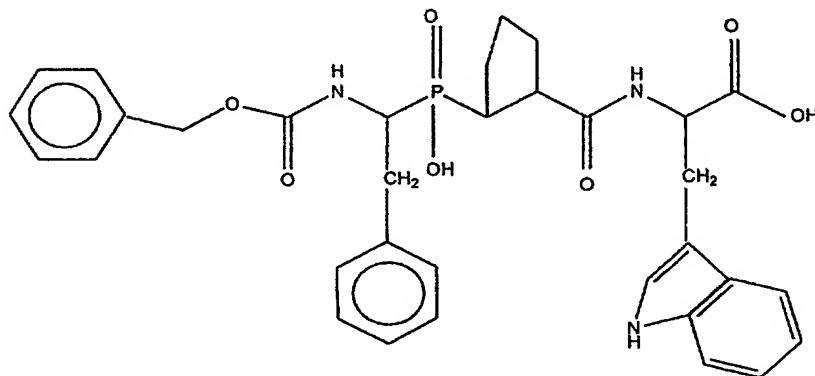
25 Selon l'invention, comme on le verra ci-après, la présence du résidu pseudo-proline est essentielle pour obtenir la sélectivité vis-à-vis du site actif C-terminal de l'ACE, mais la nature des chaînes latérales présentes en R_2 et R_3 joue aussi un rôle important dans 30 la sélectivité des interactions des dérivés de l'invention avec les sites N et C-terminaux de l'ACE.

De bons résultats en ce qui concerne l'inhibition du site C-terminal de l'ACE, ont été obtenus avec des pseudo-peptides dans lesquels le groupe R_2 représente le groupe benzyle, méthyle ou phénéthyle, soit la chaîne latérale de la phénylalanine, de l'alanine et de l'homo-phénylalanine.

5 Pour R_3 , on a obtenu de bons résultats lorsque R_3 représente la chaîne latérale de l'alanine, de l'arginine ou du tryptophane, ou lorsque l'ensemble -
10 $NH-CH(R_3)-CO-$ représente le résidu Pro.

Généralement, R_4 et R_5 représentent un atome d'hydrogène.

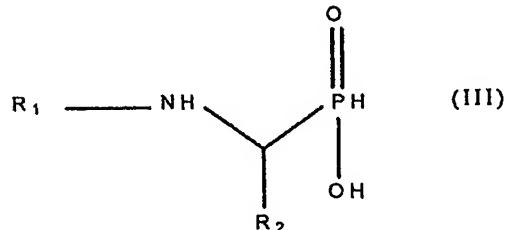
Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le dérivé de pseudo-peptide phosphinique, 15 répond à la formule suivante :



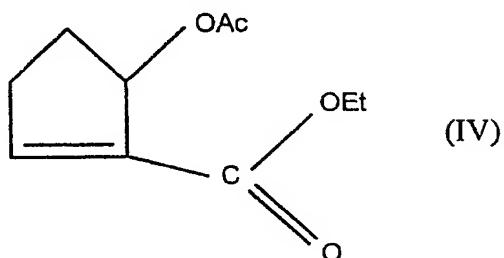
(pseudo-peptide G)

Les dérivés de pseudo-peptides phosphiniques de l'invention répondant à la formule (II) dans laquelle 20 R_4 et R_5 représentent un atome d'hydrogène, peuvent être préparés par un procédé comprenant les étapes suivantes :

1) faire réagir un composé de formule :

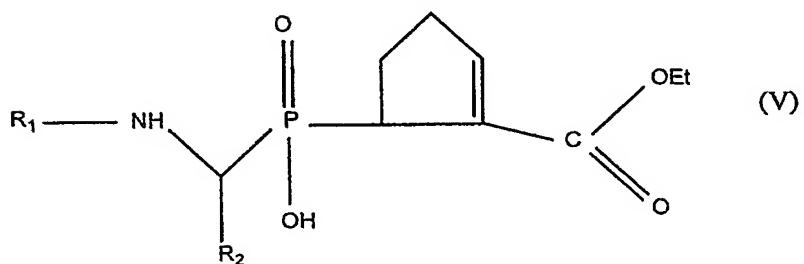


dans laquelle R_1 et R_2 sont tels que définis ci-dessus avec le composé de formule :



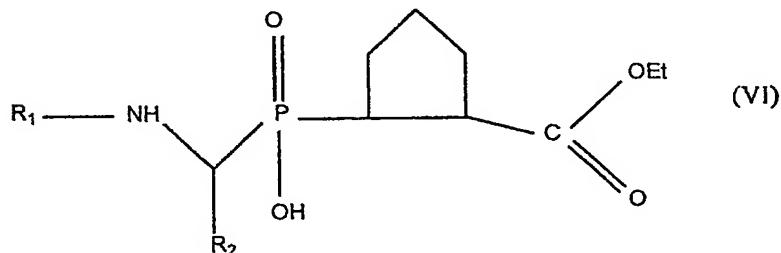
5

dans laquelle Ac représente le groupe acétyle et Et représente le groupe éthyle, pour obtenir le composé de formule (V) :

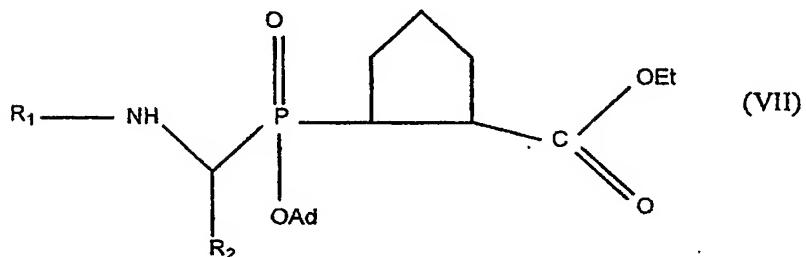


10

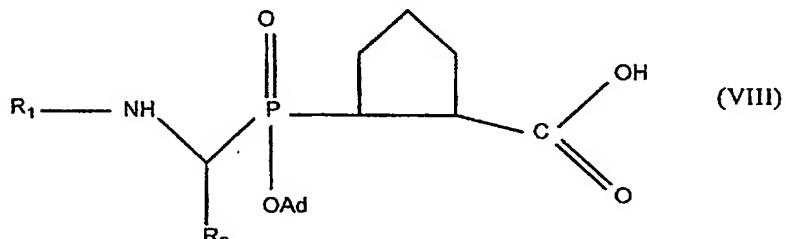
2) transformer le composé (V) en composé (VI) par réaction du composé (V) avec du borohydrure de sodium :



3) protéger le groupe hydroxyle du composé (VI) par un groupe adamantyle Ad pour obtenir le composé de formule (VII) :

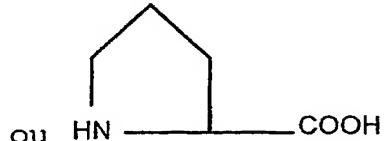
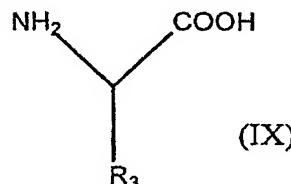


5 4) saponifier le composé (VII) pour obtenir le composé de formule (VIII) :



5) coupler le composé de formule (VIII) avec l'acide aminé de formule :

10



dans laquelle R₃ est tel que défini ci-dessus, et

6) éliminer le groupe protecteur Ad.

15

Selon ce procédé, on synthétise tout d'abord le bloc phosphinique de formule (VIII) comprenant la pseudo-proline, et on effectue ensuite un couplage peptidique de ce bloc phosphinique avec l'acide aminé voulu.

Avantageusement, l'étape 5) de couplage peptidique est réalisée par synthèse peptidique sur phase solide en utilisant comme phase solide une résine substituée par l'acide aminé de formule (IX) ou (X), dont l'extrémité N-terminale aura été préalablement protégée par un groupe Fmoc (fluorényl méthoxy carbonyle).

Si nécessaire, on peut ensuite estérifier ou salifier la fonction phosphinique du pseudo-peptide de formule (II) dans laquelle R_5 représente un atome d'hydrogène, en le faisant réagir avec des réactifs appropriés.

L'estérification peut être obtenue par couplage avec un alcool de formule R_5OH dans laquelle R_5 représente un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*, en utilisant par exemple le procédé décrit dans la référence [20] (méthode A).

On peut aussi réaliser l'estérification par réaction avec un halogénure de formule R_5X dans laquelle R_5 représente le groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*. Cette réaction peut être effectuée dans des conditions alcalines en utilisant le procédé décrit dans la référence [20] (méthode B).

Avant d'effectuer cette estérification, on protège la(les) fonction(s) acide(s) carboxylique(s) du pseudo-peptide par des groupes protecteurs appropriés que l'on élimine ensuite en utilisant des techniques classiques.

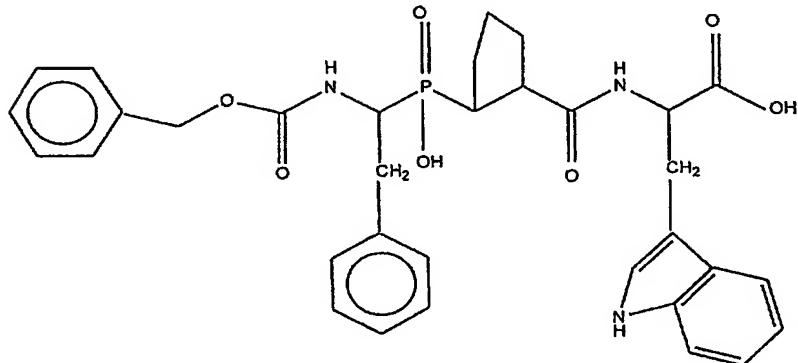
Lorsqu'on veut salifier la fonction phosphinique du pseudo-peptide de formule (II) dans laquelle R_5 est un atome d'hydrogène, pour remplacer cet atome

d'hydrogène par un contre-ion pharmaceutiquement acceptable, on fait réagir le pseudo-peptide avec une base appropriée contenant ce contre-ion, par exemple NaOH, KOH, NH₄OH.

5 On peut utiliser la même technique pour salifier le groupe carboxylique terminal du pseudo-peptide afin de remplacer l'atome d'hydrogène par un contre-ion pharmaceutiquement acceptable.

10 L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, qui comprend un dérivé de pseudopeptide phosphinique répondant à l'une des formules (I) et (II) données ci-
15 dessus.

De préférence, le dérivé pseudo-peptidique phosphinique répond à la formule :



(pseudo-peptide G)

20

Cette composition pharmaceutique qui inhibe sélectivement le site actif C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, permet de contrôler "in vivo" les taux physiologiques de l'angiotensine II et

de la bradikynine, deux hormones peptidiques jouant un rôle central dans le contrôle de la pression artérielle, mais aussi dans l'homéostase des fonctions cardiovasculaires chez l'homme. Elle trouve donc de multiples applications vis-à-vis des différentes pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un dérivé de pseudo-peptide phosphinique de formule (I) ou (II) pour la fabrication d'un médicament inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit d'exemples de réalisation, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

Brève description des dessins

La figure 1 illustre la synthèse de synthons utiles pour la préparation des pseudo-peptides phosphiniques conformes à l'invention.

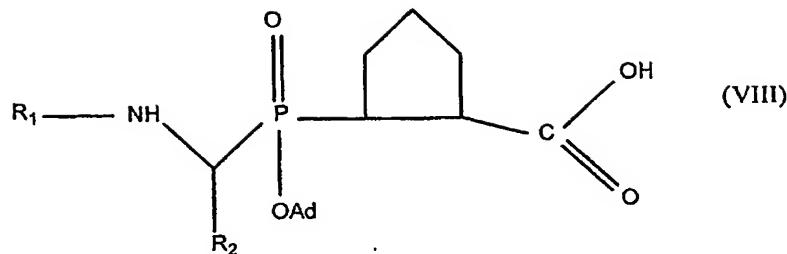
La figure 2 illustre le chromatogramme obtenu lors de la purification du pseudo-peptide G par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

25

Exposé détaillé des modes de réalisation

La synthèse des pseudo-peptides phosphiniques a été effectuée en suivant le schéma de synthèse décrit sur la figure 1.

Cette figure représente les étapes du procédé aboutissant aux synthons de formule (VIII) :



dans laquelle

5 - R_1 représente le groupe benzyloxycarbonyle (Cbz), et

6 - R_2 est le groupe phényle (composés 1a, 3a, 4a, 5a et 6a), le groupe phénéthyle (composés 1b, 3b, 4b, 5b et 6b) ou le groupe méthyle (composés 1c, 3c, 4c, 5c et 6c).

10

Exemple 1 : préparation du composé 6a.

1) Préparation du composé 1a

15 Ce dérivé d'acide amino-phosphinique est préparé selon la procédure décrite par Baylis [18], puis l'énanthiomère de configuration R est obtenu par recristallisation en suivant le protocole reporté dans Baylis [18]

2) Préparation du composé 2a

20 Ce composé est obtenu en suivant la procédure publiée par Villieras et al [19]. Le produit obtenu a été caractérisé par RMN :

25 1H -RMN (250 MHz, $CDCl_3$) : 7,03 (t, 1H), 5,93 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 2,6 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,18 (t, 3H).

3) Préparation du composé 3a

Un mélange du composé 1a (3,2 g, 10 mmol) et d'hexaméthyldisilazane (10,5 mL, 50 mmol) sous flux 5 d'argon est chauffé à 110° durant 3h. A cette température, le composé 2 (5,5 g, 12 mmol) est ajouté et cette solution est mise sous agitation pour 4h à 90°C. A cette solution refroidie à 70°C, 10 mL d'éthanol EtoH absolu sont ajoutés, goutte à goutte, le 10 mélange étant agité à 70°C pour 30 min. Après évaporation des solvants, le résidu est solubilisé dans 5% NaHCO₃ (10 mL) et 5 mL d'hexane. Après 3 extractions avec l'acétate d'éthyle AcOEt (3 x 5 mL), le produit brut est obtenu après évaporation du solvant. Une 15 purification sur colonne de silice, utilisant comme phase mobile un mélange chloroform/méthanol/acide acétique (7:0,3:0,3) permet d'obtenir 4 g de composé 3a pur, sous forme d'un solide blanc (rendement de 89%). La caractérisation RMN de ce produit est basée sur des 20 expériences COSY, TOCSY et HMQC.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) : 1,27 (t, ³J_{HH}= 7,1Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,95-3,00 (m, 5H, PCH(CH₂)₂, PhCHH), 3,13-3,45 (m, 2H, PCH, PhCHH), 4,02-4,31 (m, 2H, CH₂CH₃), 4,34- 25 4,63 (m, 1H, PCH), 4,78-5,05 (m, 2H, OCH₂Ph), 5,71 (d, 1H, NH, ³J_{HH}=11,3Hz, I), 5,78 (d, 1H, NH, ³J_{HH}=10,8Hz, II), 6,91-6,99 (d, 1H, C=CH, I/II), 7,02-7,34 (m, 10H, aryl).

¹³C-RMN (62MHz, CDCl₃) : 14,2/14,2 (CH₂-CH₃), 26,2/26,5 (PCHCH₂), 32,7/32,8 (PCHCH₂CH₂), 34,5 (CH₂Ph), 41,8 (d, ¹J_{PC}=87,7Hz, PCHC, I), 43,1 (d, ¹J_{PC}=87,3Hz, PCHC, II), 30 50,5 (d, ¹J_{PC}=99,7Hz, PCHN, I), 50,5 (d, ¹J_{PC}=100,5Hz, PCHN, II), 61,1/61,2 (CH₂CH₃), 66,8 (OCH₂Ph), 126,6, 127,7,

127,8, 127,9, 127,9, 128,4, 128,4, 129,4, 132,2, 132,3,
 132,9, 136,5, 136,6, 137,1, 137,3, (aryles), 148,1 (d,
 $^2J_{PC}=8,7\text{Hz}$, =CCO, I), 148,1 (d, $^2J_{PC}=9\text{Hz}$, =CCO, II),
 156,1 (d, $^2J_{PC}=5,5\text{Hz}$, CONH, I), 156,2 (d, $^2J_{PC}=5,7\text{Hz}$, CONH,
 5 II), 165,3 (d, $^2J_{PC}=2,7\text{Hz}$, COOEt).

^{31}P -RMN (100MHz, CDCl_3) : 46,89, 48,13.

Les mentions I et II correspondent aux différents diastéréoisomères.

10 Analyse élémentaire :

Valeurs théoriques :

C : 61,80%, H : 6,27%, N : 3,00%

Valeurs expérimentales :

C : 61,89%, H : 6,23%, N : 2,98%

15

4) Préparation du composé 4a

Le composé 3a (1,4 g, 3,06 mmol) et du $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,09 g, 9,2 mmol) sont solubilisés dans un mélange THF (12,4 mL)/méthanol (7,7 mL). A cette solution est ajouté par portions du NaBH_4 (0,58 g, 15,4 mmol) pendant 30 min, à -30°C . Ce mélange reste sous agitation pendant 10 min, à -30°C . Les solvants sont évaporés et le produit est extrait dans un mélange AcOEt (25 mL) et HCl 1N (20 mL, pH 1). La phase organique est prélevée et lavée à l'eau (10 mL), puis séchée avec Na_2SO_4 . Après évaporation des solvants, le produit est purifié sur colonne de silice avec une phase mobile chloroforme/méthanol/acide acétique (7:0,3:0,3). On obtient 1,28 g du composé 4a (rendement de 91%).

L'analyse par spectrométrie de masse mode négatif (masse observée MH^- : 458,48, masse attendue 459,47) est en accord avec la structure chimique du composé 4a.

5 Analyse élémentaire

Valeurs théoriques :

C : 61,78%, H : 6,63%, N : 3,00%

Valeurs expérimentales :

C : 61,98%, H : 6,31%, N : 3,08%

10

5) Préparation du composé 5a

L'adamantylation du composé 4a est réalisée en suivant le protocole décrit par Yiotakis et al [14]. A une solution du composé 4a (1,03 g, 2,24 mmol) dans le chloroforme, 1-Adamantyl-Br (538 mg, 2,5 mmol) et Ag_2O (577 mg), répartis en 5 portions égales, sont ajoutés pendant 1h. Après 2h, 0,5 eq d'AdBr et 0,5 eq d' Ag_2O ont été rajoutés et le mélange porté au reflux pendant 10h. Après évaporation des solvants, le produit brut a été purifié sur colonne de silice en utilisant comme phase mobile un mélange chloroforme/isopropanol (9,8 : 0,2). Le composé 5a est obtenu sous forme pure avec un rendement de 96% (1,27 g).

Analyse par spectrométrie de masse, mode positif :
masse observée MH^+ = 594,21, masse attendue 593,1.

Analyse élémentaire

Valeurs théoriques :

C : 67,76%, H : 7,53%, N : 2,32%

30 Valeurs expérimentales :

C : 67,49%, H : 7,58%, N : 2,24%

6) Préparation du composé 6a

Après dilution du composé 5a (1,1 g, 1,85 mmol) dans le méthanol (20 mL), 2 mL de NaOH 4N sont ajoutés.

5 Après 6h sous agitation, le suivi de la réaction par TLC confirme la saponification complète du produit de départ. Après évaporation du solvant, le produit est repris dans un mélange eau (10 mL), puis ajout d'AcOEt (15 mL) et acidification à pH 1 avec HCl 1N. Le résidu 10 est repris dans la phase organique et la procédure d'extraction répétée deux fois. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, puis les solvants évaporés. Le composé pur 6a est obtenu avec un rendement de 94% (0,98 g).

15 Analyse par spectrométrie de masse, mode positif : masse observée $MH^+ = 566,15$, masse attendue 565,26.

Analyse élémentaire :

Valeurs théoriques :

20 C : 67,95%, H : 7,13%, N : 2,48%

Valeurs expérimentales :

C : 67,64%, H : 7,30%, N : 2,40 %

Exemple 2 :Préparation du composé 6b

25 On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer le composé 6b en partant du composé 1b qui est préparé selon la procédure décrite dans [18].

L'analyse par spectrométrie de masse du composé 6b a donné les résultats suivants : masse attendue : 30 579,27, masse observée $MH^+ = 580,29$.

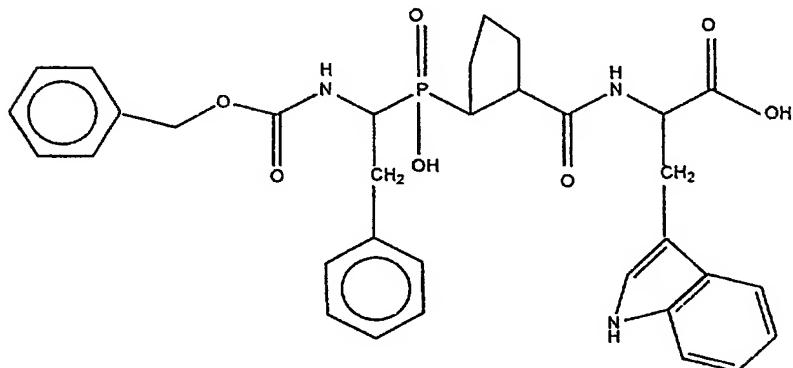
Exemple 3 : préparation du composé 6c

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer le composé 6c en partant du composé 1c qui est préparé selon la procédure décrite dans [18].

5 L'analyse par spectrométrie de masse du composé 6c a donné les résultats suivants : masse attendue : 489,23, masse observée $MH^+=490,11$.

Exemple 4 : préparation du pseudo-peptide de formule

10



(pseudo-peptide G)

15 Ce peptide a été synthétisé sur phase solide en utilisant un protocole standard de synthèse de peptides sur phase solide. La résine Wang substituée par un Fmoc-Trp (732 mg, 0,58 mmol) est suspendue dans la N-méthyl pyrrolidone NMP (5mL) et agitée pendant 5 min. Après élimination de la NMP par filtration, 10 mL de pipéridine à 20% dans NMP sont ajoutés et le mélange 20 est agité pendant 15 min. Après filtration, la résine est lavée avec les solvants suivants : NMP (7x10mL), CH_2Cl_2 (3x10mL) et Et_2O (2x10mL). Sont ajoutés alors dans le réacteur, NMP 2ml, diisopropyl éthylamine DIEA (749mg, 5,76 mmol) et le composé 6a (360mg, 0,64

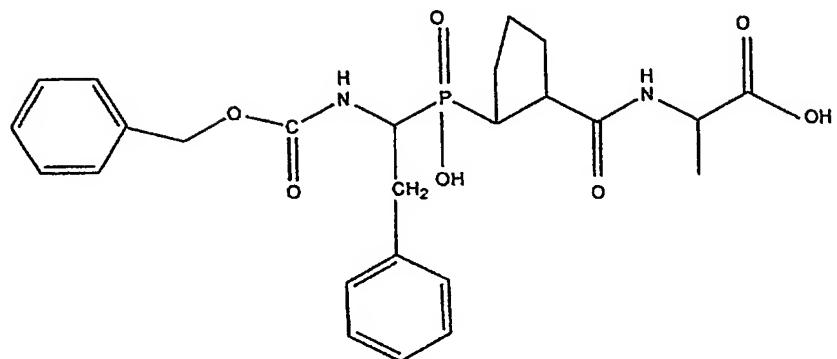
mmol) dilué dans la NMP (2mL) et 2-(1H)benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate HBTU (730mg, 1,92 mmol, dilué dans NMP 3mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant 24h. Après filtration, la 5 résine est lavée avec la NMP (4x7mL), CH_2Cl_2 (5x7mL). Puis, une solution d'acide trifluoroacétique TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O /triisopropylsilane (90/7,5/1,25/1,25) est ajouté dans le réacteur et le mélange mis sous agitation pendant 3h (phase de déprotection). Après 10 filtration, le filtrat contenant le peptide G est récupéré, le solvant est évaporé et le produit est solubilisé dans H_2O . Après lyophilisation, le peptide G est purifié par HPLC phase-inverse (colonne Vydac, C18, semi-préparative).

15 La figure 2 illustre le chromatogramme obtenu. Sur cette figure, on observe 4 pics correspondants aux 4 diastéréoisomères présents dans le peptide G (ces quatre pics possèdent un spectre de masse identique, masse observée $\text{MH}^+ = 618,23$, masse attendue 617,23). 20 Seul le pic 1 montre un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'ACE.

La caractérisation RMN du peptide G, pic 1 HPLC, est basée sur des expériences COSY, TOCSY et HMQC.

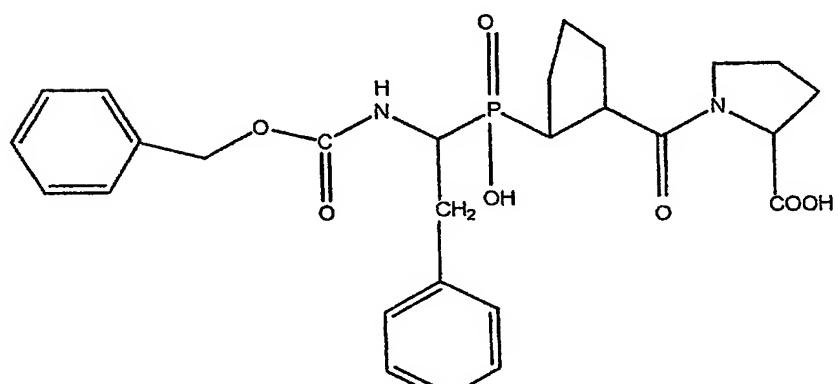
25 ^1H -RMN (250 MHz, DMSO) 4,93 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 4,01 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 2,77 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 3,08 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 3,09 (α -pseudo-Proline), 1,77 (β -pseudo-Proline), 1,56 (γ -pseudo-Proline), 1,79 (δ -pseudo-Proline), 2,49 (ε -pseudo-Proline), 4,50 (α -Trp), 3,13 (β,β -Trp), 7,6 NH, 8,3 NH, aryles 7,35-6,9.

Exemples 5 à 7 : préparation des peptides B, C et D de formules

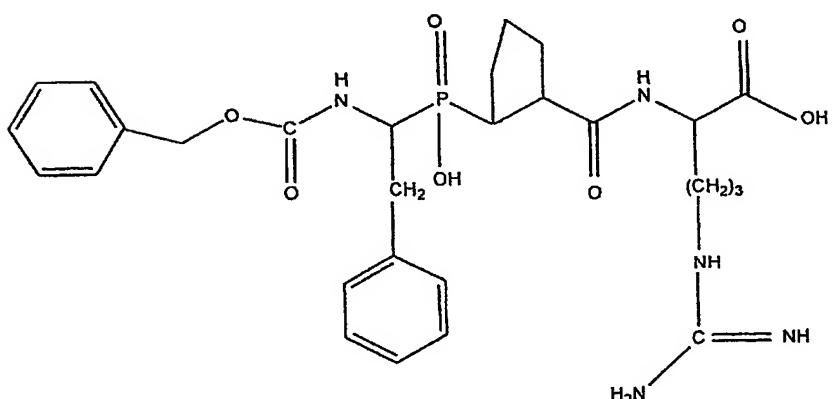


pseudo-peptide B

5



pseudo-peptide C



pseudo-peptide D

Les pseudo-peptides B, C et D ont été synthétisés en phase solide avec des résines Wang substituées par l'alanine (B), la proline (C) et l'arginine (D), en 5. utilisant le protocole décrit pour la préparation du pseudo-peptide G. La purification de ces peptides par HPLC a permis d'isoler des diastéréoisomères de ces peptides capables d'inhiber l'ACE.

10 L'analyse des peptides par spectrométrie de masse confirme la structure de ces peptides.

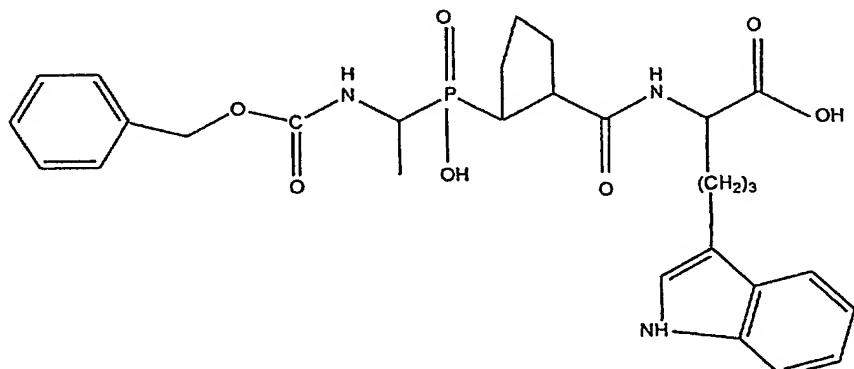
Peptide B : masse attendue 502,19 ; masse observée 503,21.

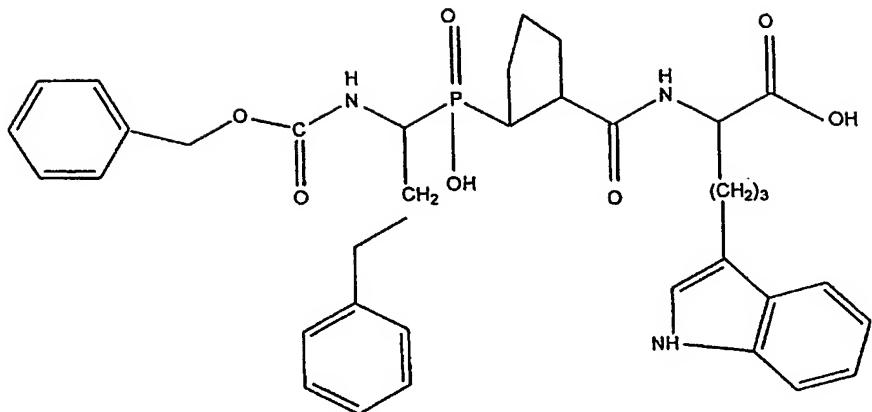
Peptide C : masse attendue 528,53 ; masse observée 529,11.

15 Peptide D : masse attendue 587,25 ; masse observée 587,24.

Exemples 8 et 9 : préparation des pseudo-peptides E et F de formules

20





pseudo-peptide F

On obtient les peptides E et F par synthèse en phase solide, en partant des composés 6b et 6c et en suivant le protocole décrit pour la préparation du peptide G. Après purification par HPLC C18 mode inverse, la première fraction collectée pour chacun de ces peptides s'est avérée capable d'inhiber l'ACE.

10 L'analyse par spectrométrie de masse a donné les résultats suivants :

Peptide E : masse attendue 541,20 ; masse observée 542,26.

Peptide F : masse attendue 631,24 ; masse observée 632,26.

15

Exemple 10 : détermination des constantes d'inhibition pour les sites N et C terminaux de l'ACE.

Pour cette détermination, on utilise de l'ACE recombinante humaine. Des courbes d'inhibition de l'ACE 20 par les pseudo-peptides A à G sont obtenues en utilisant le substrat à fluorescence quenchée :

- Mca-Ala : Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH (Mca : acide 7-méthoxycoumarine-2-acétique ; DpaOH : N-3(2,4-dinitrophénol)L-2,3-diaminopropionyl),

5 Pour ces essais, on utilise la première fraction collectée lors de la purification de chacun des pseudo-peptides A à G par HPLC (pic 1 de la figure 2 pour le pseudo-peptide G).

10 A partir des profils d'inhibition obtenus avec ce substrat, pour chaque peptide A à G, il est possible de déterminer les constantes $K_i N$ et $K_i C$ en suivant la procédure décrite dans Dive et al [8].

Les expériences d'inhibition ont été réalisées à 25°C, pH 6,8, 50 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, 200 mM NaCl.

15 Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 1 annexé.

A titre comparatif, on a effectué le même essai avec le pseudo-peptide A ne comportant pas de résidu pseudo-proline. Les résultats obtenus sont également donnés dans le tableau 1. Ce pseudo-peptide a été 20 préparé à partir du bloc phosphinique ZPhe[PO(OAd)-CH₂]AlaOH, décrit dans Yiotakis et al. [14], puis couplage de ce bloc à une résinge Wang substituée par le résidu Fmoc Ala.

25 L'étude des effets inhibiteurs des pseudo-peptides A à G sur l'ACE et la comparaison de leur affinité vis-à-vis du site N-terminal ($K_i N$) et du site C-terminal ($K_i C$) de l'ACE, Tableau 1, permettent de tirer les conclusions suivantes.

30 1°) Peptides A et B : Vis-à-vis de l'affinité envers les deux sites actifs de l'ACE, la présence d'un résidu

pseudo-proline apparaît bien moins favorable qu'un résidu pseudo-alanine. En revanche, la présence d'un résidu pseudo-proline en position P1' de ces pseudo-peptides phosphiniques donne accès à des inhibiteurs 5 sélectifs du site C-terminal de l'ACE. Ce résultat démontre le rôle essentiel du résidu pseudo-proline pour contrôler la sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis du site C-terminal de l'ACE.

10 2°) Peptides B, C, D et G : Les modifications de la position P2' avec les résidus alanine, proline, arginine et tryptophane démontrent que la nature de la chaîne latérale dans cette position est aussi un facteur essentiel de la sélectivité. La présence du 15 résidu proline (peptide C) génère un inhibiteur puissant, mais peu sélectif des sites N et C de l'ACE. Par contre, la présence d'un résidu tryptophane permet d'obtenir un inhibiteur (peptide G) extrêmement sélectif du site C-terminal de l'ACE.

20 3°) Peptides E et F : La substitution d'un résidu pseudo-phénylalanine dans la position P1 des peptides, par un résidu pseudo-alanine ou pseudo-homophénylalanine conduit à des peptides moins puissants et moins sélectifs que le peptide G. Ce 25 dernier résultat démontre une importance moindre de la position P1 des inhibiteurs vis-à-vis de la sélectivité.

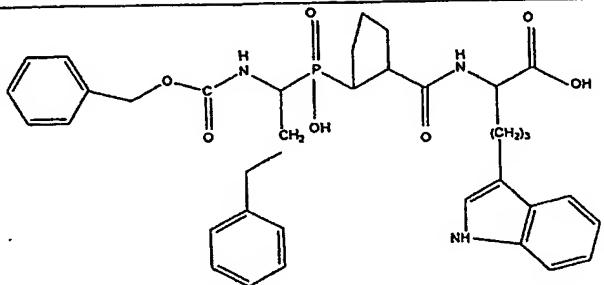
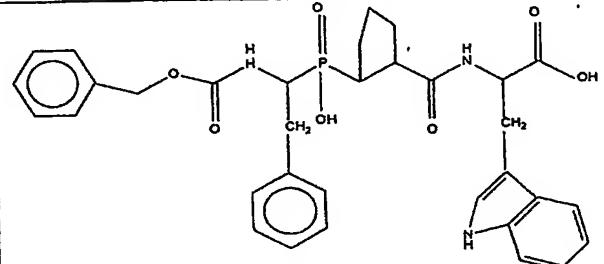
30 L'étude des peptides A à G permet de conclure que, dans les peptides de l'invention, chaque position P1,

P1' et P2' contribue à la sélectivité des interactions. La présence dans le peptide G des résidus pseudo-phénylalanine, pseudo-proline et tryptophane lui confère une sélectivité particulière.

5 Le peptide G est le premier inhibiteur capable de discriminer les deux sites actifs de l'ACE, en interagissant essentiellement avec le site C-terminal de l'ACE.

Tableau 1

Formules	Pseudo-peptide	Ki N nM(10^{-9} M)	Ki C nM(10^{-9} M)
	A	0,8	0,8
	B	450	20
	C	60	4
	D	200	9
	E	8000	60

	F	8000	60
	G	10000	3

Références

[1] Dzan, V.J. (2001) *Hypertension* 37, 1047-1052.

5

[2] Linz, W., Wiemer, G., Gohlke, P., Unger, T., and Scholckens, B. A. (1995) *Pharmacol Rev* 47(1), 25-49.

10

[3] Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., and Corvol, P. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24), 9386-90.

15

[4] Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., and Clauser, E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(14), 9002-8.

20

[5] Jaspard, E., Wei, L., and Alhenc-Gelas, F. (1993) *J Biol Chem* 268(13), 9496-503.

25

[6] Azizi, M., Rousseau, A., Ezan, E., Guyene, T. T., Michelet, S., Grognet, J. M., Lenfant, M., Corvol, P., and Menard, J. (1996) *J Clin Invest* 97(3), 839-44.

[7] WO-A-00/01706

30

[8] Dive, V., Cotton, J., Yiotakis, A., Michaud, A., Vassiliou, S., Jiracek, J., Vazeux, G.,

Chauvet, M. T., Cuniasse, P., and Corvol, P.
(1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8), 4330-5.

5 [9] Junot, C., Gonzales, M. F., Ezan, E.,
Cotton, J., Vazeux, G., Michaud, A., Azizi,
M., Vassiliou, S., Yiotakis, A., Corvol, P.,
and Dive, V. (2001) *J Pharmacol Exp Ther*
297(2), 606-11.

10 [10] FR-A2 676 059

[11] EP-A-0 725 075

15 [12] Jiracek J, Yiotakis A, Vincent B, Lecoq
A, Nicolaou A, Checler F and Dive V
Development of highly potent and selective
phosphinic peptide inhibitors of zinc
endopeptidase 24-15 using combinatorial
chemistry.
20 *J Biol Chem* 270(37): 21701-6, 1995.

25 [13] Jiracek J, Yiotakis A, Vincent B, Checler F
and Dive V
Development of the first potent and
selective inhibitor of the zinc
endopeptidase neurolysin using a systematic
approach based on combinatorial chemistry
of phosphinic peptides.
30 *J Biol Chem* 271(32): 19606-11, 1996.

[14] Yiotakis A, Vassiliou S, Jiracek J, Dive V
Protection of the hydroxyphosphinyl
function of phosphinic dipeptides by
adamantyl. Application to the solid-phase
synthesis of phosphinic peptides
5 *J. Org. Chem.* 61 : 6601-6605, 1996

[15] Vassiliou S, Mucha A, Cuniasse P, Georgiadis
D, Lucet-Levannier K, Beau F, Kannan R, Murphy
10 G, Knauper V, Rio MC, Basset P, Yiotakis A and
Dive V
Phosphinic pseudo-tripeptides as potent
inhibitors of matrix metalloproteinases: a
structure-activity study.
15 *J. Med. Chem.* 42(14): 2610-20, 1999

[16] Georgiadis D, Vazeux G, Llorens-Cortes
C, Yiotakis A and Dive V
Potent and selective inhibition of zinc
20 aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by
glutamyl aminophosphinic peptides:
importance of glutamyl aminophosphinic
residue in the P1 position.
Biochemistry 39(5): 1152-5, 2000.
25

[17] Protective groups in Organic Synthesis,
Second Edition, T.W. Green et P.G.M. Wuts,
John Wiley & Sons, Inc, pages 309-315.

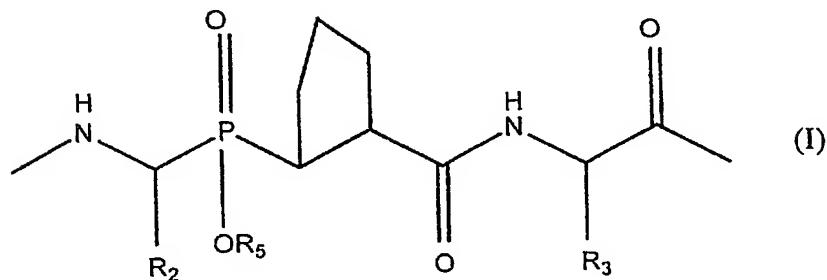
30 [18] Baylis E.K., Campbell C.D., Dingwall J.G.
1984, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 2845.

[19] Villieras, J. Rambaud, W.H. Graff, M. 1986,
Synth. Commun. 16, 149.

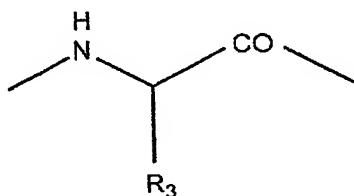
[20] Chen H., Noble F., Roques P., Fournie-
5 Zaluski M.C., 2001, J. Med. Chem. 44,
p. 3523-3530.

REVENDICATIONS

1. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique comportant la séquence d'acides aminés de formule 5 suivante :

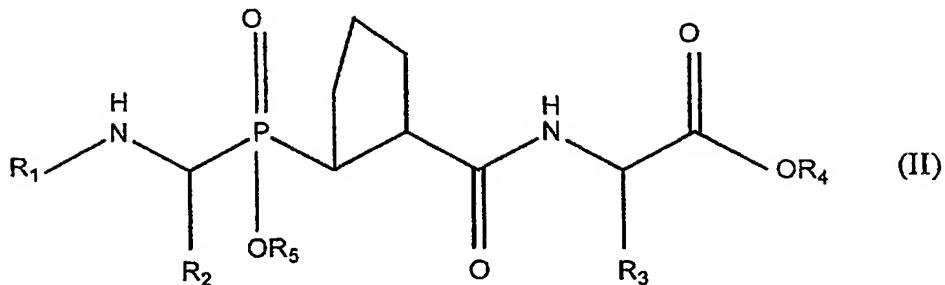


10 dans laquelle R_2 et R_3 qui sont identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :

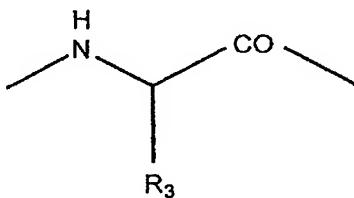


15 pouvant aussi former le résidu Pro, et R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

20 2. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique répondant à la formule suivante :



5 dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



10

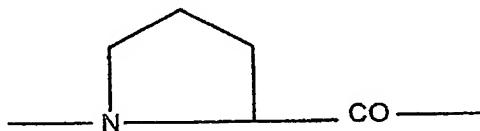
pouvant aussi former le résidu Pro, R_4 représente un atome d'hydrogène, ou un contre-ion pharmaceutiquement acceptable, et R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, 15 ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

20 3. Dérivé de pseudo-peptide selon la revendication 2, dans lequel R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine choisi parmi les groupes acétyle, benzyloxycarbonyle.

4. Dérivé de pseudo-peptide selon la revendication 1 à 3, dans lequel R₂ représente le groupe benzyle, méthyle ou phénéthyle.

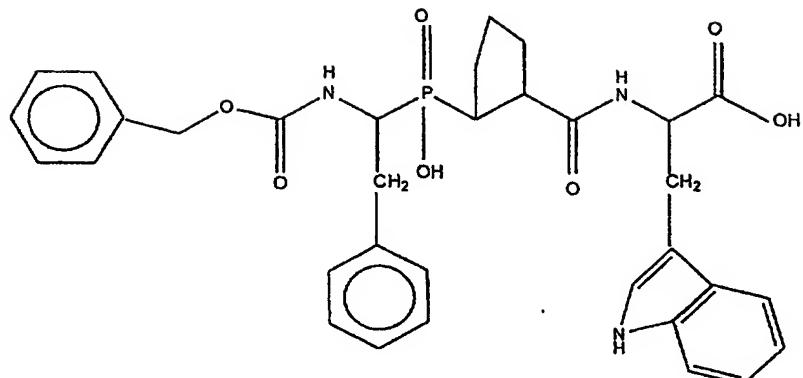
5 5. Dérivé de pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel R₃ représente la chaîne latérale de lalanine, de larginine ou du tryptophane.

10 6. Dérivé de pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel lensemble -NH-CH(R₃)-CO- représente le résidu Pro :



15 7. Dérivé de pseudo-peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel R₄ et/ou R₅ représentent un atome d'hydrogène.

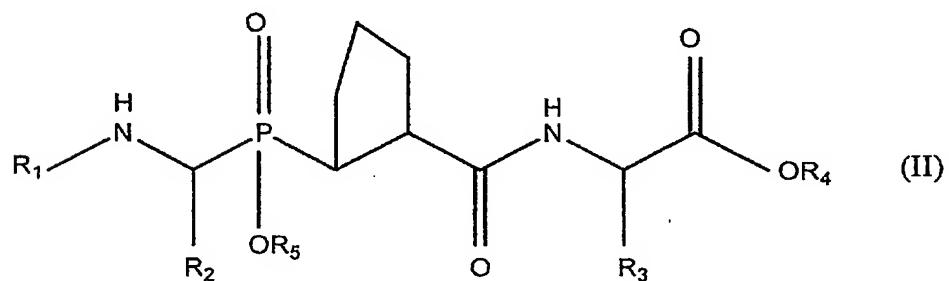
20 8. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique de formule :



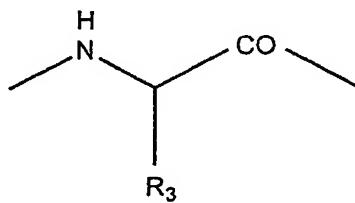
(pseudo-peptide G)

9. Procédé de préparation d'un pseudo-peptide de formule :

5



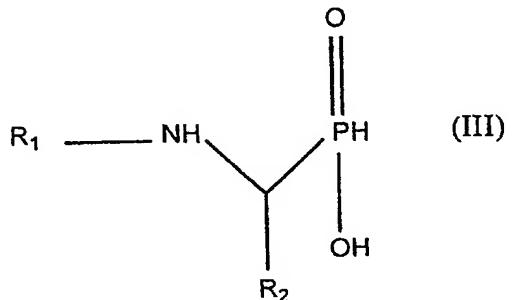
10 dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine, R_2 et R_3 qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



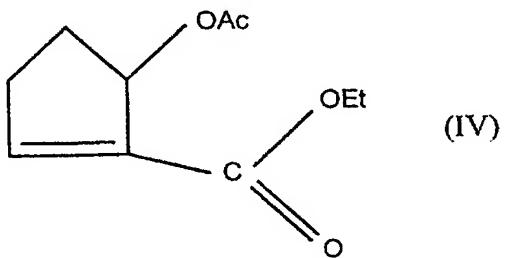
15

pouvant aussi former le résidu Pro, et R₄ et R₅ représentent un atome d'hydrogène, qui comprend les étapes suivantes :

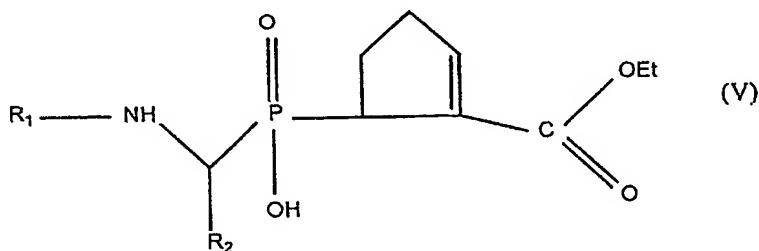
1) faire réagir un composé de formule :



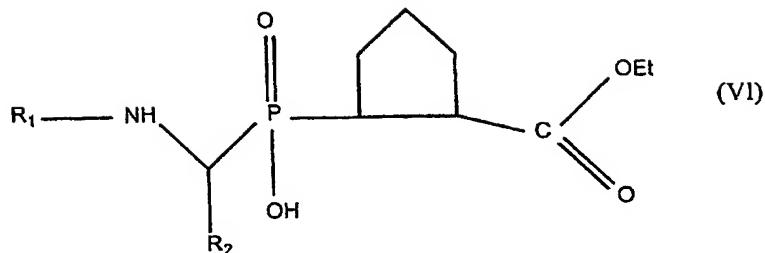
dans laquelle R₁ et R₂ sont tels que définis ci-dessus, avec le composé de formule :



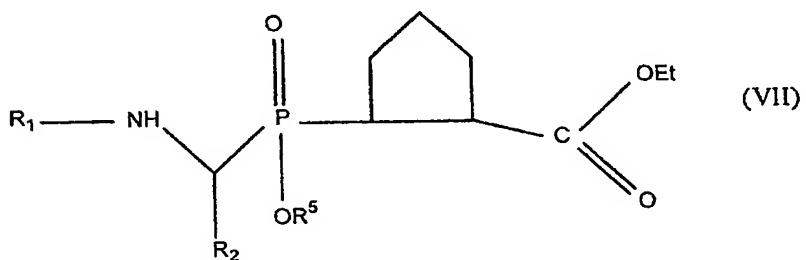
10 dans laquelle AC représente le groupe acétyle et Et représente le groupe éthyle, pour obtenir le composé de formule (V) :



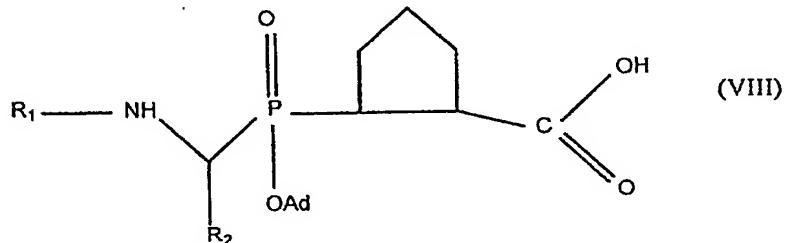
2) transformer le composé (V) en composé (VI) par réaction du composé (V) avec du borohydrure de sodium :



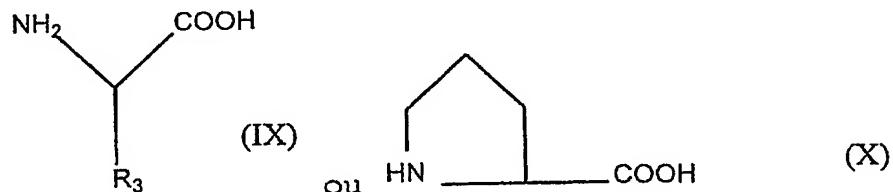
3) protéger le groupe hydroxyle du composé (VI) par un groupe protecteur R_5 , par exemple le groupe adamantyle Ad, pour obtenir le composé de formule 5 (VII) :



4) saponifier le composé (VII) pour obtenir le composé de formule (VIII) :



10 5) coupler le composé de formule (VIII) avec l'acide aminé de formule :

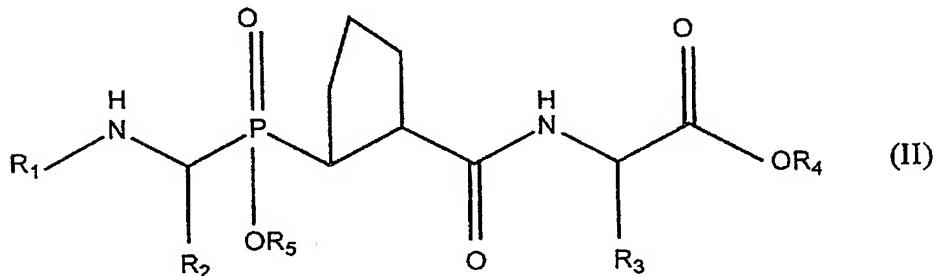


15 dans laquelle R_3 est tel que défini ci-dessus, et
6) éliminer le groupe protecteur Ad.

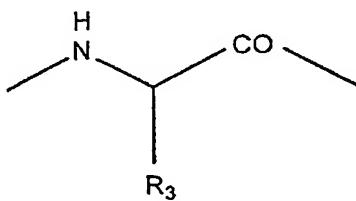
10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel l'étape 5) de couplage peptidique est réalisée par synthèse peptidique sur phase solide en utilisant comme phase solide une résine substituée par l'acide aminé de formule (IX) ou (X).

11. Procédé de préparation d'un pseudo-peptide de formule :

10



15 dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine, R_2 et R_3 qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :

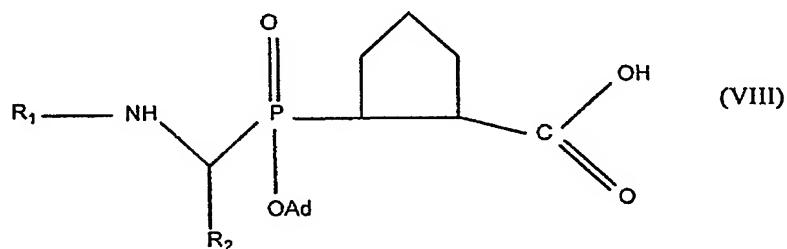


20

pouvant aussi former le résidu Pro, R_4 représente un atome d'hydrogène et R_5 représente un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*,

caractérisé en ce que l'on estérifie la fonction phosphinique du pseudo-peptide obtenu par le procédé de la revendication 9 ou 10, par couplage avec un alcool de formule R_5OH ou par réaction avec un halogénure de formule R_5X où X représente un atome d'halogène.

12. Composé de formule :



10

dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine, et R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel.

13. Composition pharmaceutique inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, comprenant un dérivé de pseudo-peptide phosphinique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

14. Utilisation d'un dérivé de pseudo-peptide phosphinique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

1 / 2

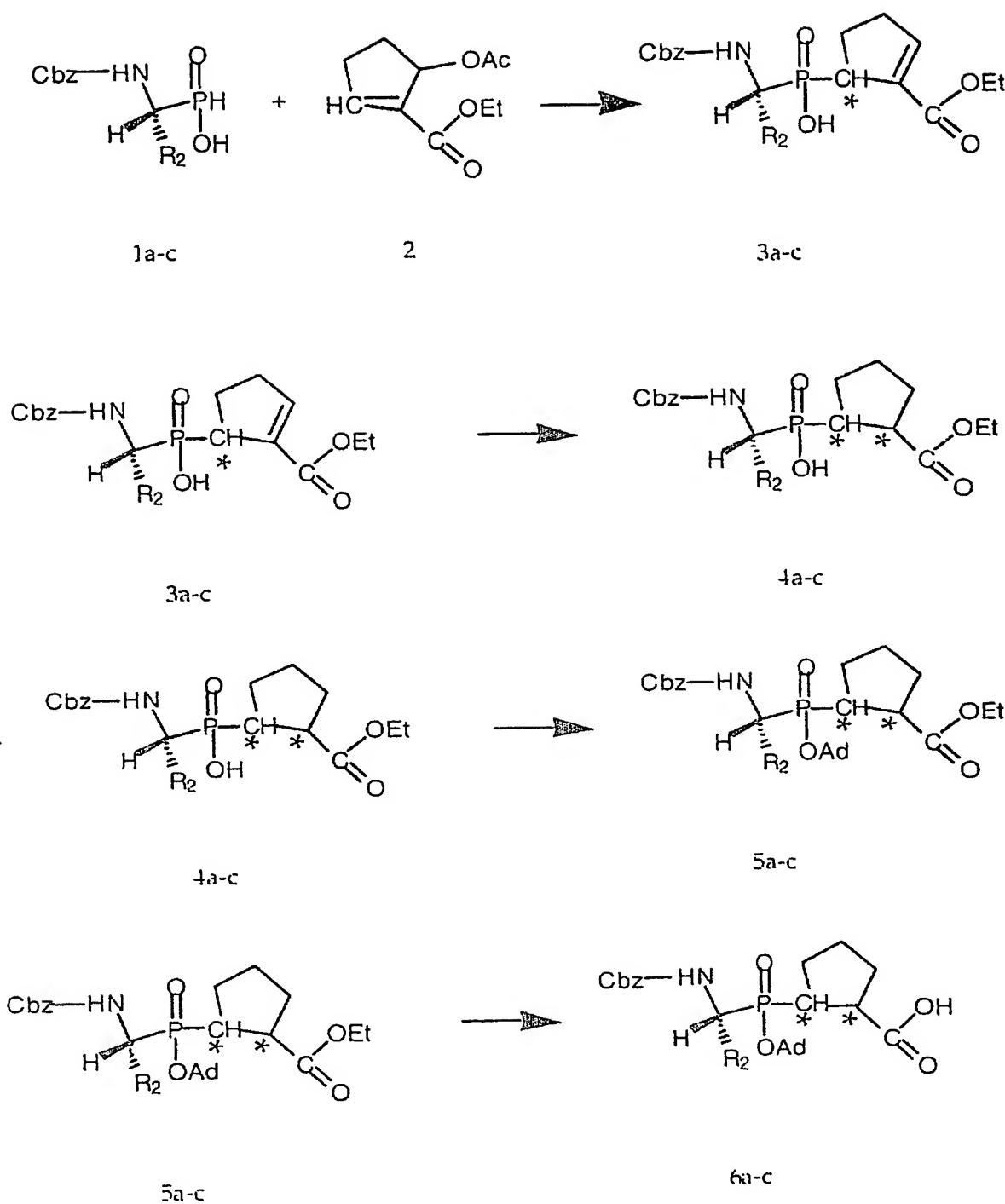


FIG. 1

2 / 2

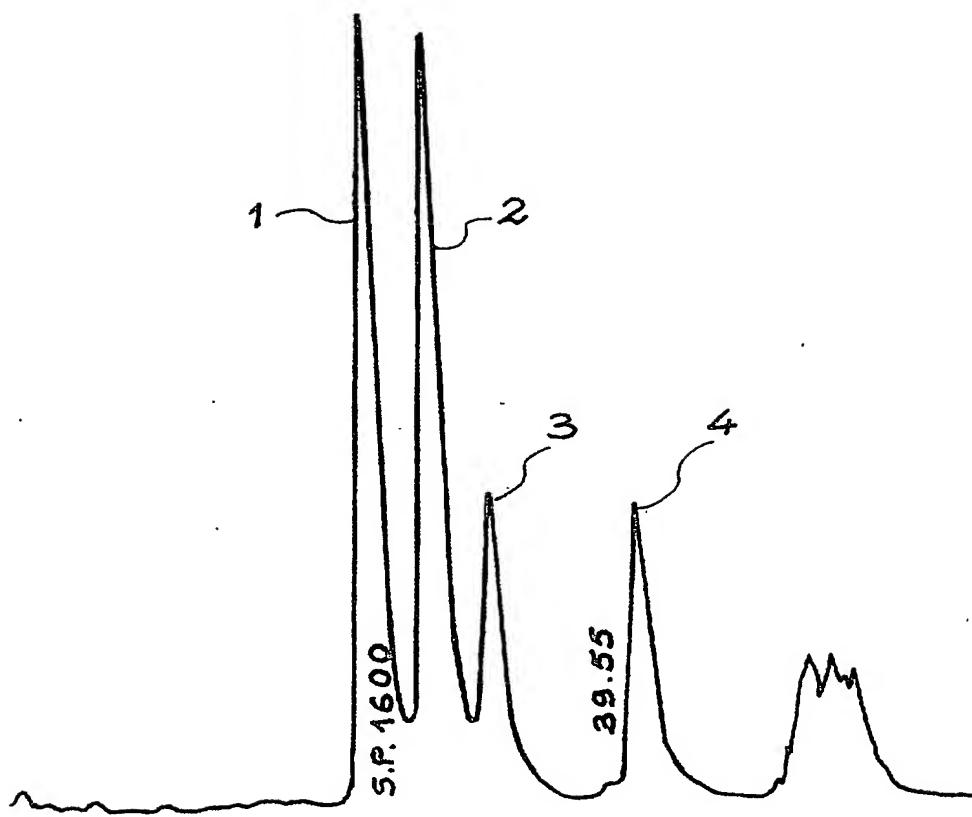


FIG. 2



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

certificat
N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1... / 1...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet Imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	B 13999.3 MDT1	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0200599	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
DERIVES DE PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES INHIBANT SELECTIVEMENT LE SITE ACTIF C-TERMINAL DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I(ACE)		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33, rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		COTTON
Prénoms		Joël
Adresse	Rue	159, boulevard de Mondétour
	Code postal et ville	91400 ORSAY FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		GEORGIADIS
Prénoms		Dimitri
Adresse	Rue	Iraclitou 53, Archarnai
	Code postal et ville	ATHENES GRECE
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		DIVE
Prénoms		Vincent
Adresse	Rue	13, rue des Pêcheurs
	Code postal et ville	91120 PALAISEAU FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 18 janvier 2002		
M. DES TERMES		